



Molekulárně genetické vyšetření vybraných sekvenčních variant genů asociovaných s rozvojem kardiovaskulárních onemocnění

- FV (Leiden, R2)
- FII-protrombin (G20210A)
- MTHFR (C677T, A1298C)
- β -fibrinogen (-455G>A)
- FXIII (V34L)
- PAI-1 (4G/5G)
- GPIIIa (L33P)
- ApoB(R3500Q)
- ApoE E2/E3/E4
- ACE (I/D)

Kardiovaskulární choroba (CVD) je obecně používaným termínem pro onemocnění srdce a cévního systému. K dnešnímu dni je znám velký počet genetických změn, u nichž byla buď prokázána, nebo se předpokládá spojitost se vznikem kardiovaskulárních onemocnění. V kombinaci s dalšími rizikovými faktory, jak negenetickými (kouření, nadváha, dietní návyky, věk, nedostatečný pohybový režim, pozitivní amamnéza), tak genetickými (současná přítomnost více mutací či polymorfismů najednou), se riziko rozvoje choroby dále zvyšuje. Genetická predispozice k CVD může být způsobena výskytem mutací a polymorfismů v celé řadě genů kódujících proteiny účastnících se především procesu srážení krve (koagulační faktory), fibrinolýzy, regulace krevního tlaku, ale také metabolismu lipidů a homocysteinu. Mutace v těchto genech mohou být příčinou celoživotně zvýšeného rizika vzniku kardiovaskulárních onemocnění. Mezi kandidátní geny, jejichž určité sekvenční varianty mohou být asociovány s rozvojem CVD, patří geny pro:

- koagulační faktor V (FV)
- faktor II (protrombin)
- faktor XIII (FXIII)
- 5,10 – metylentetrahydrofolát reduktázu (MTHFR)
- angiotensin konvertující enzym (ACE)
- β – fibrinogen (FGB)
- destičkový glykoprotein IIIa (GPIIIa)
- inhibitor aktivátoru plazminogenu (PAI – 1)
- apolipoprotein B (Apo B) a apolipoprotein E (Apo E)



Koagulační faktor V – FV (Leiden, Cambridge a R2 mutace)

(OMIM 227400)

Faktor V je kofaktorem pro přeměnu protrombinu na trombin.

Leidenská mutace ve faktoru V: G1691A nebo také Arg506Gln (R506Q), tato mutace postihuje kritická štěpná místa proteinu s následným ovlivněním jeho aktivity. Relativní riziko vzniku trombózy hlubokých žil je u heterozygotních přenašečů 5 – 10 x vyšší než u běžné populace, u homozygotů je toto riziko až 80 x vyšší.

R2 mutace ve faktoru V: A4070G nebo také His1299Arg (H1299R). FV R2 zvyšuje riziko žilní trombózy zvláště ve spojení s Leidenskou mutací (uvádí se až 10x vyšší riziko trombózy), rovněž se uvádí, že průměrný věk první tromboembolické příhody je o 6 let nižší u jedinců, kteří jsou heterozygoti pro FV Leiden a FV R2.

Koagulační faktor II – FII protrombin (mutace G20210A)

(OMIM 176930)

Protrombin je inaktivním prekurzorem trombinu.

Mutace G20210A je asociována se zvýšenou hladinou protrombinu. Heterozygotní přenašeči mají o 30 % zvýšenou hladinu plazmatického protrombinu a 2-3x vyšší riziko trombózy hlubokých žil. S uvedenou mutací je rovněž spojováno zvýšené riziko vzniku mozkové a hluboké žilní trombózy, plicní embolie. Riziko dále narůstá především v těhotenství, operativních zákrocích, imobilizaci, kouření, obezitě atd.

Enzym metylentetrahydrofolát reduktázu – MTHFR (C677T, A1298C)

(OMIM 607093)

MTHFR se účastní regulace metabolismu homocysteinu.

Heterozygoti a homozygoti nesoucí uvedené sekvenční varianty mívají redukovanou aktivitu tohoto enzymu (homozygoti nesoucí mutaci C677T mají cca 30% aktivitu enzymu MTHFR oproti jedincům bez mutace), která může vést k hyperhomocysteinémií (OMIM 236250), která patří mezi rizikové faktory kardio- a cerebrovaskulárních chorob, rovněž vysoká hladina homocysteinu může vést k defektům neurální trubice během prenatálního vývoje.



Koagulační faktor XIII – FXIII (V34L)

(OMIM 134570)

Faktor XIII hraje důležitou roli při stabilizaci krevních sraženin díky schopnosti sesítovat fibrinová vlákna (účinkem aktivovaného faktoru XIII (FXIIIa) a v přítomnosti Ca^{2+} dochází k tvorbě pevných příčných vazeb mezi jednotlivými vlákny fibrinu a vytváří se tak trojrozměrná síť stabilního, mechanicky odolného nerozpustného fibrinu) Polymorfismus V34L (Val34Leu) v genu FXIII se vyskytuje zhruba u 23 % kavkazské populace; V34L způsobuje předčasné vyčerpání pozměněného proteinu z krevního oběhu, což snižuje tvorbu nerozpustného fibrinu a tak může mít antitrombotický efekt.

Destičkový glykoprotein III – GPIIIa (L33P)

(OMIM +173 470)

Integrin beta-3 gen (ITGB3) kóduje glykoprotein IIIa (GPIIIa), podjednotku destičkového membránového receptorového komplexu GPIIb/GPIIIa

Komplex GPIIb/GPIIIa řídí shlukování destiček, neboť funguje jako receptor pro fibrinogen (také pro fibronektin a von Willebrandův faktor).

Sekvenční varianta L33P: záměna tyminu (T) za cytosin (C) v nukleotidové pozici 1565 genu GPIIIa, tato záměna nukleotidu způsobuje záměnu aminokyseliny leucinu (L) za prolin (P) v pozici 33 proteinu.

Nejčastější varianta genu nesoucího v pozici 33 proteinu GPIIIa aminokyselinu leucin je známá pod označením PI A1 (HPA – 1a).

Varianta genu nesoucího v pozici 33 proteinu GPIIIa aminokyselinu prolin je známá pod označením PI A2 (HPA – 1b), touto záměnou dochází ke změnám v prostorovém uspořádání proteinu.

Frekvence výskytu PI(A2) je zhruba 15% v bělošské populaci.

Varianta PI (A2) může zvyšovat riziko tromboembolických komplikací u koronární srdeční choroby, rovněž byla pozorována vyšší frekvence výskytu této varianty u rodin s četnými infarkty myokardu.

Společný výskyt varianty 4G v genu pro PAI-1 a PI(A2) může zvyšovat riziko infarktu myokardu. L33P je také zodpovědná za neonatální alloimunitní trombocytopenii a postransfúzní purpuru.

Angiotensin konvertující enzym – ACE (polymorfismus I/D)

(OMIM +106180)

ACE přeměňuje angiotensin I na angiotensin II hraje důležitou roli v regulaci krevního tlaku.



Hladina ACE v plazmě se může u zdravých osob lišit až pětinasobně; uvádí se, že až 50 % této variability je způsobeno uvedeným polymorfismem.

Frekvence výskytu DD genotypu se v celkové populaci uvádí 27 %.

Genotyp D/D genotyp je spojen vyšší hladinou ACE v séru a rizikem vzniku ischemické choroby srdeční (IČHS).

β-fibrinogen – FGB (-455G>A)

(OMIM 134830)

Fibrinogen je plasmatický glykoprotein – molekulu tvoří dimer složený z řetězců α, β, γ (kódovanými třemi různými geny)

Fibrin je důležitý pro vazbu krevních destiček; mutace -455 G→A: záměna guaninu (G) za adenin (A) v pozici -455 promotorové oblasti genu kódujícího FGB

Mutace je asociována se zvýšenou hladinou plasmatického fibrinogenu u obou pohlaví a tato vyšší koncentrace v krvi bývá spojována i s některými chorobami např. cerebrovaskulárními.

Inhibitor aktivátoru plazminogenu – PAI-1 (4G/5G)

(OMIM 173360)

PAI-1 je součástí fibrinolytického systému a hraje důležitou roli v kontrole koagulace.

Váže se na tkáňový plasminogen a inhibuje aktivaci plasminogenu.

Polymorfismus 4G/5G: jedná se o delecii/inzerci jednoho guanosinu (G) v pozici -675 v promotorové oblasti genu PAI-1. 4G alela je asociována se zvýšenou transkripcí genu PAI-1 a zvýšenou hladinou plasmatického PAI-1 proteinu. Homozygoti s genotypem 4G/4G mají hladinu plasmatického PAI-1 o 25% vyšší než homozygoti s genotypem 5G/5G. Vyšší hladina plasmatického PAI-1 je asociována s progresí koronárního syndromu a rozvojem infarktu myokardu. U těhotných žen s genotypem 4G/4G je pozorován vyšší výskyt komplikací během těhotenství.

Apolipoprotein B – ApoB (R3500Q)

(OMIM 107730)

Uskutečňuje transport lipidů v séru ve formě lipoproteinových komplexů (LDL).

ApoB má klíčový význam pro vazbu na LDL receptory.

Gen ApoB kóduje dvě formy apolipoproteinu (jedna forma je syntetizována v hepatocytech (ApoB-100) a druhá v epiteliálních střevních buňkách (ApoB 48).



Sekvenční varianta R3500Q: záměna guaninu (G) za adenin (A) v nukleotidové sekvenci na pozici 10708 genu kódujícího ApoB, tato záměna nukleotidu způsobuje záměnu aminokyseliny argininu (R) za glutamin (Q) v pozici 3500 proteinu. Pro správnou funkci proteinu je nutné správné složení proteinu – nutná vzájemná interakce argininu (R) v pozici 3500 a tryptofanu v pozici 4369 proteinové sekvence – mutace R3500Q má za následek nesprávné složení proteinu a tím i snížení vazebné schopnosti pro LDL receptor, což má za následek zvýšení hladiny na cholesterol bohatých LDL částic. Frekvence této mutace se v kavkazské populaci pohybuje v rozmezí 1:500 – 1:700.

Defekt ApoB-100 je příčinou hypercholesterolemie (tzv. FDB- familiární defekt apolipoproteinu-B - autozomálně dominantního onemocnění).

Apolipoprotein E – ApoE (E2/E3/E4)

(OMIM 107741)

Protein podílející se na transportu, skladování a metabolismu cholesterolu.

Nejčastější jsou tři izoformy apolipoproteinu E: Apo E2, E3, E4 – kódované třemi alelami (ϵ_2 , ϵ_3 , ϵ_4 – existuje tedy 6 možných genotypů: 3/3, 4/3, 3/2, 4/4, 4/2 a 2/2 – seřazeny od nejčastějšího po nejméně častý).

Jednotlivé izoformy se liší ve dvou místech v aminokyselinové sekvenci (v pozici 112 a 158) E2 má v proteinu na obou pozicích cystein, E3 má v sekvenci proteinu cystein a arginin, E4 má v proteinové sekvenci na obou pozicích arginin.

Nejčastěji vyskytující se alelou je alela ϵ_3 .

Alela ϵ_4 je spojována se zvýšenou hladinou plasmatického cholesterolu a tím i zvýšeným rizikem ICHS.

Rovněž mnohé studie ukazují, že alela ϵ_4 je spojena s vyšším rizikem rozvoje Alzheimerovy choroby (AD) a snížením průměrného věku začátku choroby (~65% pacientů s AD nese alespoň jednu alelu ϵ_4 a 12-15% jsou homozygoti nesoucí alelu ϵ_4/ϵ_4 , v běžné populaci je frekvence homozygotů nesoucích alelu ϵ_4 ~ 1-3%).

Alela ϵ_2 má nižší afinitu pro LDL receptor a je asociována s hyperlipoproteinemií typu III.

V naší laboratoři vyšetřované mutace a polymorfismy:

- v genu pro koagulační faktor V – FV Leiden – (R506Q) – FV R2 – (H1299R)
- v genu pro faktor II – FII (protrombin) – G20210A
- v genu pro methylenetetrahydrofolát reduktázu (MTHFR) – C677T, A1298C
- v genu pro faktor XIII (FXIII) – V34L
- v genu pro angiotensin konvertující enzym (ACE) – Ins/Del
- v genu pro β -fibrinogen (FGB) – -455 G>A
- v genu pro destičkový glykoprotein IIIa (GPIIIa) – L33P
- v genu pro inhibitor aktivátoru plazminogenu (PAI -1) – 4G/5G (-675delG)
- v genu pro apolipoprotein B (Apo B) – R3500Q
- v genu pro apolipoprotein E (Apo E) – E2/E3/E4



Materiál pro vyšetření:

- 5 ml venózní krve odebrané do EDTA (krev s heparinem nelze použít!), označené minimálně dvěma identifikačními symboly: jménem a datem narození (nebo rodným číslem pacienta)
- vyzolovaná DNA rozpuštěná ve vodě nebo TE pufri, řádně označená 2 identifikačními symboly – jménem a rodným číslem pacienta
- příložená žádanka specifikující druh požadovaného vyšetření a obsahující nezbytné údaje o pacientovi a informovaný souhlas pacienta s požadovaným vyšetřením

Metoda detekce:

Multiplex polymerázová řetězová reakce (PCR) s následnou reverzní hybridizací – kity CVD StripAssay™, CVD StripAssay TTM(ViennaLab).

Transport vzorků do laboratoře:

Zajištěn svozem CGB laboratoře a.s. [Více info zde...](#)

Délka trvání vyšetření a způsob vydání závěrečné zprávy:

- požadované vyšetření a vydání závěrečné zprávy je realizováno do 7-10 pracovních dnů po převzetí vzorku
- v případě vzorku s označením STATIM je vyšetření a vydání závěrečné zprávy provedeno do 2-3 pracovních dnů po převzetí vzorku
- závěrečné zprávy o výsledku jsou z laboratoře zasílány písemně pouze zadavateli vyšetření – lékaři, oprávněnému indikovat vyšetření